

10/509565

Rec'd WPTO

509,565  
29 SEP 2004

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年12月31日 (31.12.2003)

PCT

Rec'd WPTO 29 SEP 2004  
WO 2004/001047 A1(51) 国際特許分類:  
I/19, I/21, 5/10, A61P 13/12

C12N 15/11, I/15,

(74) 代理人: 長井 省三, 外(NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007807

(22) 国際出願日: 2003年6月19日 (19.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-180543 2002年6月20日 (20.06.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 武田 正敬 (TAKEDA, Masayoshi) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 阿部 邦威 (ABE, Kunitake) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 山地 昇 (YAMAJI, Noboru) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROMOTER

(54) 発明の名称: 新規プロモーター

(57) Abstract: It is intended to disclose a promoter of protease MDTS9 which is useful as a tool in screening a remedy and/or a preventive for chronic kidney failure, is derived by TGF- $\beta$ , participates in the metabolism of extracellular matrix, and shows an elevated gene expression dose in a model animal of kidney failure; and a method of screening a remedy and/or a preventive for chronic kidney failure which comprises selecting an inhibitor for the above promoter.(57) 要約: 慢性腎不全治療及び/又は予防剤のスクリーニングツールとして有用な、TGF- $\beta$ により誘導され、細胞外マトリクスの代謝に関与し、腎不全モデル動物においてその遺伝子発現量が増加しているプロテアーゼMDTS9のプロモーター、本プロモーターの阻害剤を選択することによる、慢性腎不全治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法を開示する。

WO 2004/001047 A1

## 明細書

## 新規プロモーター

## 技術分野

本発明は、新規なプロモーターに関する。

## 背景技術

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin motif) は、ディスインテグリン様ドメイン、金属プロテアーゼ様ドメイン、及びトロンボスポンジン I 型繰り返し配列（以下、TSP-1 繰り返し配列と称する）を含む分子群である。

前記ヒト ADAMTS 分子の中で、ADAMTS4（アグリカナーゼー 1）及び ADAMTS11（アグリカナーゼー 2）では、細胞外基質アグリカンを選択的に切断する活性が示され、関節炎や変形性関節症における軟骨細胞外基質アグリカンの分解の本体の酵素である可能性が示唆されていた (Tortorella M. D. ら, Science, 284, 1664-1666, 1999 ; 及び Abbaszade I. ら, J. Biol. Chem., 274, 23443-23450, 1999)。また、ADAMTS2（プロコラーゲン I N-プロテイナーゼ）は、I 型コラーゲンプロ体の N 末部の切断除去酵素として、I 型コラーゲンのプロ体から成熟型への転換に関与し、コラーゲン線維の形成に重要な役割を果たしており、その遺伝子の異常と VIIC 型エーラース・ダンロス (Ehlers-Danlos) 症候群との関連性が示されている (Colige A. ら, Am. J. Hum. Genet., 65, 308-317, 1999)。

すなわち、ADAMTS 分子は、アグリカンやコラーゲン等の細胞外マトリクスの分解及び成熟といった代謝に関与することが示されている。

一方、慢性腎不全は、糸球体硬化及び腎間質線維化を特徴とする疾患であり、細胞外マトリクス成分の質的变化及び／又は量的増加が主要な発病及び進行機序とされている。トランスフォーミング増殖因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は、多種多様の生理機能を示す分化及び成長因子であることが知られており、細胞外マトリクス成分の

質的变化及び量的増加に係わる作用を持つことも知られている (Border, W. A ら, N. Engl. J. Med., 331, 1286-1292, 1996 ; Rberts, A. B. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83, 4167-4171, 1986; Fukabori, Y ら, Int. J. Urol., 4, 597-602, 1997; Lohr, M ら, Cancer Res., 61, 550-555, 2001) 。腎不全疾患モデルを用いた実験において、TGF- $\beta$  の特異的な作用抑制タンパク質であるデコリンの遺伝子導入 (Isaka Y. ら, Nature Med., 2, 418-423, 1996) や抗 TGF- $\beta$  投与 (Ziyadeh F. N. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97, 8015-8020, 2000; Sharma K. ら, Diabetes, 45, 522-530, 1996; 及び Border W. A. ら, Nature, 346, 371-374, 1990) が有効性を示したことより、TGF- $\beta$  の生理機能を抑制又は阻害することが慢性腎不全の治療に繋がると考えられている。

しかし、満足のいく慢性腎不全治療薬がない現状のもと、期待されているにもかかわらず、現在までに TGF- $\beta$  阻害剤は上市されていない。

また、間質の炎症、ひいては繊維化を生じる機序に関しては様々な検討がなされている。腎臓では糸球体で産生・放出された IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインにより尿細管上皮細胞が活性化され、MCP-1 などのケモカイン、インテグリン、オステオポンチンなどの細胞接着分子や細胞外基質を生産して細胞浸潤を促進し、浸潤してきた単球やTリンパ球は更に新たなサイトカインを分泌することで尿管上皮細胞や浸潤細胞に作用して炎症巣が生じ、細胞外マトリクス成分の分解を伴う組織破壊が起こる。破壊された組織の修復の過程での過修復、繊維芽細胞や筋繊維芽細胞(myofibroblast)の関与により、細胞外マトリクス成分の質的变化及び量的増加が起こることも繊維化の機序として考えられている (岡田浩一, 別冊・医学のあゆみ 糸球体腎炎の発症と治療, 120-123, 2001) 。

NCBI データベースにおいて AC010269 として、187084bp のヒト染色体5クローン CTC-485121 の配列が開示されている (非特許文献 1 参照) 。公知配列との相同性分析に基づき ADAMTS ファミリーに属すると推定される、卵巣での高発現、性周期による発現変動、及び腫瘍細胞における存在低下が知られているタンパク質をコードする cDNA 及びその推定アミノ酸配列が知られている (特許文献 1 参照) 。また、ADAM ファミリーと推定される配列を含む、ゲノムデータベースを利用し、

プロテアーゼをコードすると推定される多数の塩基配列、及び、それがコードする推定アミノ酸配列が知られている（特許文献2参照）。

非特許文献1

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list\\_uids=15281193&dopt=GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=15281193&dopt=GenBank) AC010269

特許文献1 国際公開第 W002/31163 号パンフレット

特許文献2 国際公開第 W001/83782 号パンフレット

## 発明の開示

TGF- $\beta$  は、多種多様の生理機能を示す分化及び成長因子であるため、TGF- $\beta$  の生理機能全てを阻害することは、長期投与が想定される慢性腎不全の治療においては問題が生じるおそれがある。TGF- $\beta$  の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害することが望ましい。

本発明の課題は、慢性腎不全治療及び／又は予防剤のスクリーニングツールとして有用な、TGF- $\beta$  により誘導され、細胞外マトリクスの代謝に関与する新規プロテアーゼのプロモーターを提供することにある。

本発明者は、前記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、配列番号2で表される配列における第1番～第1224番の配列からなる新規プロテアーゼMDTS9をコードするポリヌクレオチドを取得し、続いてヒトゲノムDNAよりMDTS9のプロモーターを取得した。また、前記プロテアーゼは、（1）ADAMTSプロテアーゼに分類されることより、細胞外マトリクスの代謝に関与するプロテアーゼであると考えられること、（2）実際に、ヒトの腎臓での発現が認められること、（3）腎不全モデル動物において、その遺伝子発現量が増加していることを見出し、更に（4）TGF- $\beta$  によりプロモーター活性が亢進（すなわちプロテアーゼ発現誘導）されることを確認した。これらにより、MDTS9は、腎不全の原因となるポリペプチドであり、本ポリペプチドのプロモーターを用いて、MDTS9の発現を抑制する物質をスクリーニングすることにより、TGF- $\beta$  の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に関わる部分だけを抑制又は阻害する

慢性腎不全治療及び／又は予防剤として有用な物質をスクリーニングできることを明らかにした。また、マトリクス・メタロ・プロテアーゼ（MMP）などの細胞外マトリクス分解酵素の発現を誘導する炎症性サイトカインの一つである IL-1 では本発明のプロモーターの活性が減弱する（すなわちプロテアーゼ発現が抑制される）こと、すなわち、本プロテアーゼの発現誘導が炎症時ではなく、組織の修復や細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加を特徴とする腎繊維化の過程に特異的であることを見出し、本発明のプロモーター阻害剤が慢性腎不全治療及び／又は予防剤として有用であることをさらに明らかにし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号 17 の 3 2 5 3 番目から 5 0 2 3 番目で表される塩基配列、あるいは、配列番号 17 の 3 2 5 3 番目から 5 0 2 3 番目で表される塩基配列において、1～10個の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含み、配列番号 2 記載のポリペプチドのプロモーター活性を有するポリヌクレオチド、
- (2) 配列番号 17 で表される塩基配列、あるいは、配列番号 17 記載の塩基配列の中において、1～10個の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含む、(1) 記載のポリヌクレオチド、
- (3) 配列番号 17 の 3 2 5 3 番目から 5 0 2 3 番目で表される塩基配列、又は、配列番号 17 で表される塩基配列を含む、(1) 記載のポリヌクレオチド、
- (4) (1) 乃至 (3) 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、
- (5) (4) 記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞、
- (6) (1) 記載のポリヌクレオチド、又は、(5) 記載の細胞からなる慢性腎不全治療及び／又は予防用物質スクリーニングツール、
- (7) (1) 記載のポリヌクレオチド、又は、(5) 記載の細胞の慢性腎不全治療及び／又は予防用物質スクリーニングのための使用、
- (8) ① (5) 記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び、② プロモーター活性を検出する工程を含む、試験化合物が (1) 乃至 (3) 記載のポリヌクレオチドのプロモーター活性を阻害するか否かを分析する方法、

(9) (8) 記載の方法による分析工程、及びプロモーター活性を阻害する物質を選択する工程を含む、配列番号 2 記載のポリペプチドの発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、

(10) (9) 記載の方法により、慢性腎不全治療及び／又は予防用物質をスクリーニングする方法、及び

(11) (8) 記載の方法による分析工程、及び製剤化工程を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法、  
に関する。

なお、AC010269 には、187084bp の一部分として配列番号 17 記載の塩基配列を含む配列を開示しているが、187084bp からなる配列を MDTS9 コーディング配列の上流につなげても、MDTS9 プロモーター活性を示すとは考えがたく、MDTS9 のプロモーター活性があることや、慢性腎不全治療及び／又は予防剤のスクリーニングに関しては何ら開示されていない。W002/31163 には、配列番号 2 記載のアミノ酸配列と 1 アミノ酸違う配列が記載され、該配列を有するポリペプチドは、卵巣の細胞外マトリックスの分解及び再構築に関与することを示唆している。また、W001/83782 には、配列番号 2 記載のアミノ酸配列と 2 アミノ酸違う配列が記載されているが、該配列を有するポリペプチドを取得したこと、及び活性や機能を確認したことは記載されていない。そして、前記 2 件の公報に記載された配列を有するポリペプチドが慢性腎不全の原因であること、MDTS9 のプロモーター、及び、MDTS9 のプロモーターを用いた慢性腎不全治療及び／又は予防剤のスクリーニングに関しては開示も示唆もない。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、pGV-B2-MDTS9pro5k を導入した細胞において、TGF- $\beta$  添加によりルシフェラーゼ活性が上昇することを示す図である。

図中、縦軸は、ルシフェラーゼ活性測定値を同時導入した  $\beta$ -gal 発現プラスミドより発現した  $\beta$ -gal の活性値で補正し、TGF- $\beta$  非処理の pGV-B2 (空ベクター) 導入細胞の補正值を 1 として示した相対値、横軸は、TGF- $\beta$  の濃度である。

図 2 は、pGV-B2-MDTS9pro5k を導入した細胞において、IL-1 添加によりルシフェラーゼ活性が減弱することを示す図である。

図中、縦軸は、ルシフェラーゼ活性測定値を同時導入した  $\beta$ -gal 発現プラスミドより発現した  $\beta$ -gal の活性値で補正し、IL-1 非処理の pGV-B2 (空ベクター) 導入細胞の補正值を 1 として示した相対値、横軸は、IL-1 の濃度である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のプロモーターであるポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞

本発明者らは、細胞外マトリックスの代謝に関与するプロテアーゼであり、ヒトの腎臓での発現が認められ、腎不全モデル動物において、その遺伝子発現量が増加している MDTS9 (Metalloprotease and Disintegrin with Thrombospondin type-1 repeats 9) をコードするポリヌクレオチド及びそのプロモーターを得、塩基配列を決定した (配列番号 17)。取得したプロモーターの全長及び部分断片 (配列番号 17 の 3253 番目から 5023 番目) を適当なプラスミド、具体的には、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミド pGV-B2 内にサブクローニングした。この融合プラスミドのレポーター遺伝子の発現、すなわち、活性によりルシフェラーゼの発現を検出することにより、得られたポリヌクレオチドがプロモーター活性を有していることを確認した。また、本発明者らは、配列番号 17 記載のポリヌクレオチドが、TGF- $\beta$  によりプロモーター活性が上昇し、IL-1 によりプロモーター活性が減弱することを見出した。

前述のとおり、MDTS9 の発現を抑制 (プロモーター阻害) する物質が慢性腎不全治療及び／又は予防剤として有用であるので、本発明のプロモーターは、阻害剤をスクリーニングするためには、有用である。MDTS9 プロモーター阻害剤をスクリーニングするためには、配列番号 17 中の TGF- $\beta$  応答領域を含む配列を必ず

しも用いる必要はなく、例えば、配列番号 17 の 3 2 5 3 番目から 5 0 2 3 番目を用いて、実施例 7 記載の方法でスクリーニングすることも可能である。したがって、本発明のプロモーターは、配列番号 17 の 3 2 5 3 番目から 5 0 2 3 番目の塩基配列を含み、MDTS9 プロモーター活性を有していれば、5' 領域のいかなる塩基配列をさらに含んでも良い。より好ましくは、配列番号 17 の塩基配列を含み、MDTS9 プロモーター活性を有しているポリヌクレオチドであり、更に好ましくは、配列番号 17 の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。また、配列番号 17 の 3 2 5 3 番目から 5 0 2 3 番目の塩基配列の中のいずれかの 1 ~ 10 個(好ましくは 1 ~ 5 個、より好ましくは 1 ~ 3 個)の部位において、1 乃至複数個(好ましくは 1 ~ 10 個、より好ましくは 1 ~ 5 個、さらに好ましくは 1 ~ 3 個)の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含み、MDTS9 プロモーター活性を有するポリヌクレオチドも、より好ましくは、配列番号 17 記載の塩基配列の中のいずれかの 1 ~ 10 個(好ましくは 1 ~ 5 個、より好ましくは 1 ~ 3 個)の部位において、1 乃至複数個(好ましくは 1 ~ 10 個、より好ましくは 1 ~ 5 個、さらに好ましくは 1 ~ 3 個)の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含み、MDTS9 プロモーター活性を有するポリヌクレオチドも、本発明のプロモーターに含まれる。「プロモーター活性」とは DNA 鎖の情報を RNA 鎖に転写するための開始部位として働く活性を意味し、「MDTS9 プロモーター活性を有する」とは、実施例 2 記載の方法でプロモーター活性を確認できることであり、より好ましくは、実施例 3 記載の方法で TGF- $\beta$  によりプロモーター活性が亢進することを意味する。

本発明のポリヌクレオチドは、実施例記載の方法で製造する以外に、下記の方法で製造することもできる。

#### ① PCR 法を用いた製造

実施例 1 記載のように、プライマーとヒトゲノム DNA を用いて PCR を行い、配列番号 17 の塩基配列を含む DNA を製造することができる。一般に、アレル変異体の存在は良く知られている。本方法で DNA を製造した場合に、配列番号 17 の塩基配列の中のいずれかの部位において、塩基が置換、欠失、及び／又は挿入さ



れている塩基配列を含み、MDTS9 プロモーター活性を有する DNA が得られる場合もあるが、これも本発明のプロモーターに含まれる。

## ② DNA 合成を用いた製造

配列番号 17 記載の配列及びその相補鎖を、何本かに分割して化学合成法によって製造し、これらの DNA 断片を結合することによっても製造できる。各 DNA 断片は、DNA 合成機(例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman 社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems 社)など)を用いて合成することができる。

製造したポリヌクレオチドが MDTS9 プロモーター活性を有するか否かは、例えば、実施例 2 又は実施例 3 記載の方法で確認することができる。

当業者であれば、天然型に存在するプロモーター配列の塩基配列の一部を他の塩基への置換や塩基の欠失、及び／又は付加などの改変により、天然型のプロモーターポリヌクレオチドと同等のプロモーター活性を有するポリヌクレオチドを調製することが可能である。このように天然型の塩基配列において塩基が置換、欠失、及び／又は付加した塩基配列を有し、天然型のプロモーターポリヌクレオチドと同等のプロモーター活性を有するポリヌクレオチドもまた本発明のポリヌクレオチドに含まれる。塩基の改変は、例えば、制限酵素あるいは DNA エキソヌクレアーゼによる欠失導入、部位特異的変異誘発法による変異導入(Nucleic Acid Res. 10, 6487 (1982))、変異プライマーを用いた PCR 法によるプロモーター配列の改変、合成変異 DNA の直接導入などの方法により行うことができる(Maniatis, T. et al. (1989) : "Molecular Cloning - A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> Edt." Cold Spring Harbor Laboratory, NY)。

本発明の MDTS9 プロモーターであるポリヌクレオチドは、生体内における変異に由来した MDTS9 蛋白質の欠損又は発現異常症の治療や予防に利用することも可能である。例えば、本発明の MDTS9 プロモーターと MDTS9 コーディング領域を含む MDTS9 遺伝子を、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のベクターに挿入し、又はリポソームなどに封入して体細胞に導入することにより、

正常な転写制御下に MDT S9 蛋白質を発現させることができ、これにより MDT S9 蛋白質の欠損又は発現異常症などに対する改善を図ることが可能となる。

配列番号 17 記載の DNA の少なくとも一部分を含む DNA は、プロモーター活性を有するか否かを問わず、本発明の MDT S9 プロモーターとこれに結合しうる蛋白質(例えば、転写因子)との結合を拮抗阻害しうる。このため該 DNA が、本発明のプロモーターの活性を阻害する蛋白質の結合部位に相当する場合には、この DNA を投与することによりプロモーター活性を促進することができ、逆にプロモーター活性を促進する蛋白質の結合部位に相当する場合には、この DNA を投与することによりプロモーター活性を阻害することができる。拮抗阻害に用いる DNA は、通常少なくとも 6 塩基以上、好ましくは 10 塩基以上の鎖長を有する。

本発明の組換えベクターは、目的に応じ適宜選択したベクターに、本発明のポリヌクレオチドを組み込むことにより製造できる。例えば、MDT S9 プロモーター活性を調節する物質のスクリーニング系構築を目的とする場合は、実施例に記載したように、ルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を組み込んだベクターに本発明のポリヌクレオチドを組み込んで製造することが好ましい。また、MDT S9 蛋白質の欠損又は発現異常症の遺伝子治療を目的とする場合は、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のベクターに、本発明のプロモーターと MDT S9 コーディング領域の DNA を組み込むことにより製造できる。

本発明の形質転換体は、目的に応じ適宜選択した宿主細胞に、本発明のポリヌクレオチドを組み込むことにより製造できる。例えば、MDT S9 プロモーター活性を調節する物質のスクリーニング系構築を目的とする場合は、ヒトあるいはマウス、ラットなどの哺乳動物由来で、腎臓組織由来の細胞を用いることが好ましい。

## (2) 本発明の分析方法及びスクリーニング方法

本発明のプロモーターを用いることにより、試験化合物が、MDT S9 のプロモーター活性を阻害するか否かを分析することができる。また、この本発明の分析方法を用いると、MDT S9 プロモーター活性を阻害する物質をスクリーニングするこ

とができる。MDTS9はその配列より ADAMTS プロテアーゼであると考えられることから、細胞外マトリクスの代謝に関与するプロテアーゼであると考えられ、後述の参考例5及び参考例7に示すように、ヒトの腎臓で発現しているタンパク質であり、参考例6で示すように腎不全モデル動物において、その遺伝子発現量が増加しているおり、しかも、後述の実施例3に示すように、TGF- $\beta$ により誘導され、IL-1により発現が抑制される ADAMTS プロテアーゼである。従って、本発明のプロモーターの活性を阻害する物質は、TGF- $\beta$ の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に係わる部分だけを抑制又は阻害する可能性が高く、長期投与が想定される慢性腎不全治療剤の有効成分として有用であり、本発明のプロモーターを発現する細胞を、本発明のプロモーターの活性を阻害する物質、あるいは、慢性腎不全治療及び／又は予防用物質のスクリーニングツールとして使用することができる。

本発明の分析方法又はスクリーニング方法にかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物(ペプチドを含む)、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995)又は通常の合成技術によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法(Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。前記公知化合物には、例えば、プロモーター阻害活性を有することが知られているが、本発明のプロモーターの活性を阻害するか否かが不明な化合物(ペプチドを含む)が含まれる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物(ペプチドを含む)を、化学的又は生物学的に修飾した化合物(ペプチドを含む)を用いることができる。

本発明の分析方法は、

- ①本発明のプロモーターを含む発現ベクターでトランスフェクションされた細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び、②プロモーター活性を検出する工程

を含む、試験化合物が本発明のプロモーターの活性を阻害するか否かを分析する方法を含む。

プロモーター活性を検出する方法としては、特に限定されないが、実施例2又は実施例3に記載したような配列番号17記載の配列を含むレポーター遺伝子プラスミドを用いる方法が簡便である。レポーター遺伝子とは通常的手段(例えば、酵素活性の測定等、当業者に既知の定量法)によって定量することができる蛋白をコードする遺伝子を指し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ遺伝子がよく用いられているがこれらに限定されない。レポーター遺伝子プラスミドを構築する基となるベクターに関しては制限はなく、市販のプラスミドベクター、例えば、pGV-B2(東洋インキ社製)やpSEAP2-Basic(Clontech社製)などを用いることができる。これらのベクターのレポーター遺伝子の上流に当該配列を順方向に挿入したレポーター遺伝子プラスミドを構築し、このプラスミドで形質転換した細胞において発現されるレポーター蛋白の量をそれぞれに適した方法で測定することにより当該配列のプロモーター活性の有無、強度を知ることができ、また、上記形質転換細胞の培養液に試験化合物を添加することにより、試験化合物の当該プロモーター活性に及ぼす作用を分析することができる。

また、本発明には、①上記分析工程、及び、②プロモーター活性を阻害する物質を選択する工程を含む、配列番号2記載のポリペプチド(MDTS9)の発現を抑制する物質をスクリーニングする方法、又は慢性腎不全治療及び／又は予防用物質をスクリーニングする方法も含まれる。

上記スクリーニング法で選択するプロモーター活性を阻害する物質としては、後述の実施例3に記載の方法で、TGF- $\beta$ 処理のみの場合のプロモーター活性の90%以下になる物が好ましく、TGF- $\beta$ 未処理と同等かそれ以下になる物がさらに好ましい。

### (3) 本発明の慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法

本発明には、(2)記載の本発明の分析方法による分析工程、及び、製剤化工程を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法も含まれる。本発明の慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法には、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の品質規格の確認試験において、本発明の分析方法により、本発明のプロテアーゼの活性を阻害するか否かを分析する工程、及び製剤化工程を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法も含まれる。

また、本発明には、本発明のスクリーニング方法により選択される、本発明のプロテアーゼの活性を阻害する物質を有効成分とする慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物、並びに、本発明のプロテアーゼの活性を阻害する物質を投与することからなる慢性腎不全治療及び／又は予防方法が包含される。そして、

(2)記載の本発明の分析工程を含む本発明のスクリーニング方法で得られた物質を製剤化することからなる、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法も本発明の慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法に含まれる。

本発明のプロテアーゼの活性を阻害する物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注若しくは筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあつては、静注等の非経口投与又は消化を受けない製剤化手段、例えば、WO 95/28963号パンフレットに記載の製剤化手段を適用するのが好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成

物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆することができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水溶性若しくは非水溶性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して適宜決定することができる。例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重 60kg として）において、1日につき約 0.01～1000mg、好ましくは 0.01～100mg である。また、非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき 0.01～1000mg、好ましくは 0.01～100mg である。

#### 実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に断らない限り、公知の方法(例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989)に従って実施した。

#### 参考例 1 : C 末 FLAG 付加型発現ベクターの作製

プラスミド pCEP4 (インビトロジェン社製) を、制限酵素 ClaI 及び NsiI で切断し、平滑末端化した後、自己連結反応を行なうことにより、エプスタイン・バーウイルス由来の EBNA1 発現ユニットを除去した発現ベクター pCEP4d を作製した。得られた発現ベクター pCEP4d を、制限酵素 NheI 及び BamHI で切断した後、アガロースゲル抽出することにより得られた約 7.7kbp の DNA 断片に、配列番号 3 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 4 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをアニールさせて得られた二重鎖オリゴヌクレオチドを挿入することにより、発現ベクター pCEP4d-FLAG を作成した。なお、得られた発現ベクターが目的の配列を有することは、塩基配列により確認した。

得られた発現ベクター pCEP4d-FLAG を鋳型とし、配列番号 5 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 6 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとして、パイロベスト (PyroBest™) DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いて PCR を行なった。前記 PCR では、最初に 94°C (2 分間) で熱変性を行なった後、94°C (30 秒間) と 55°C (30 秒間) と 72°C (30 秒間) とからなるサイクルを 15 回繰り返す、最後に 72°C (7 分間) の伸長反応を行なった。前記 PCR により生じた約 0.4kbp の DNA 断片を制限酵素 SpeI で切断した後、この DNA 断片を、制限酵素 XbaI で切断した pCEP4d-FLAG (約 7.7kbp) に挿入することにより、発現ベクター pCEPdE2-FLAG を作成した。得られた発現ベクター pCEPdE2-FLAG においては、プロモーターから下流に向かって、クローニングサイトである XbaI 認識配列、NheI 認識配列、NotI 認識配列、及び BamHI 認識配列、並びに FLAG タグがこの順に配列されている。

**参考例 2 : 新規プロテアーゼ遺伝子 MDT59 の全長 ORF 遺伝子のクローニング**

配列番号 7 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (5' 側に SpeI 認識配列及び Kozak 配列が付加してある) と配列番号 8 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (5' 側に NotI 認識配列が付加してある) との組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓 cDNA (Marathon-Ready™ cDNA ; クロンテック社製) を鋳型として、DNA ポリメラーゼ (TaKaRa LA Taq™ ; 宝酒造社製) を用いて PCR を行なった。前記 PCR では、最初に 94℃ (2 分間) で熱変性を行なった後、98℃ (10 秒間) と 68℃ (2 分 30 秒間) とからなるサイクルを 40 回繰返し、最後に 68℃ (7 分間) の伸長反応を行なった。前記 PCR により生成した約 2.2kbp の DNA 断片 (5' 側に SpeI 認識配列及び Kozak 配列が付加され、3' 側に NotI 認識配列が付加されている) を、プラスミド PCR2.1 (インビトロジェン社製) にサブクローンすることにより、クローン pMDT59Cys1 を得た。

得られたプラスミド pMDT59Cys1 を制限酵素 SpeI 及び NotI で切断して生成した約 2.2kbp の DNA 断片を、前記参考例 1 で構築した pCEPdE2-FLAG の XbaI 部位及び NotI 部位に挿入することにより、プラスミド pCEPdE2-MDT59Cys1-FLAG を構築した。

配列番号 9 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (5' 側に SpeI 認識配列及び kozak 配列が付加してある) と配列番号 10 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、ヒト胎児腎臓 cDNA (Marathon-Ready™ cDNA ; クロンテック社製) を鋳型として、DNA ポリメラーゼ (TaKaRa LA Taq™ ; 宝酒造社製) を用いて PCR を行なった。前記 PCR では、最初に 94℃ (2 分間) で熱変性を行なった後、98℃ (10 秒間) と 68℃ (30 秒間) とからなるサイクルを 45 回繰返し、最後に 68℃ (7 分間) の伸長反応を行なった。前記 PCR により生成した約 0.2kbp の DNA 断片 (5' 側に SpeI 認識配列及び Kozak 配列が付加されている) を、プラスミド PCR2.1 (インビトロジェン社製) にサブクローンすることにより、クローン pMDT59 (5S2-12) を得た。挿入断片は、配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA であり、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 1224 番のアミノ酸からなる配列をコードする。



得られたプラスミド pMDTS9 (5S2-12) を制限酵素 SpeI 及び NcoI で切断して生成した約 0.2kbp の SpeI-NcoI DNA 断片 A と、先に得られたプラスミド pMDTS9Cys1 を制限酵素 NcoI 及び NotI で切断して生成した約 2.0kbp の NcoI-NotI DNA 断片 B とを、前記参考例 1 で構築した pCEPdE2-FLAG の XbaI 部位及び NotI 部位に挿入することにより、プラスミド pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG を構築した。同様に、前記 DNA 断片 A と前記 DNA 断片 B とを、プラスミド pZErO-2 (インビトロジェン社製) の SpeI 及び NotI 部位に挿入することにより、プラスミド pZErO-MDTS9Cys2 を構築した。

プラスミド pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG は、新規プロテアーゼ遺伝子 MDTS9 の配列番号 1 で表される塩基配列における第 1 番～第 2250 番の塩基からなる遺伝子含有し、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 1 番～第 750 番のアミノ酸からなる配列の C 末端に、配列番号 11 で表されるアミノ酸配列が付加したポリペプチドを、動物細胞を宿主として、発現することができる。なお、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、ADAMTS プロテアーゼであると考えられる。

### 参考例 3 : MDTS9 短長タンパク質 (MDTS9Cys2) の発現

参考例 2 で作製したプラスミド pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG 又は対照として、参考例 1 で作製したプラスミド pCEPdE2-FLAG を、市販のトランスフェクション試薬 (FuGENE™6 Transfection Reagent ; ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて、添付指示書に従い、血清培地 [DMEM (GIBCO-BRL 社)、10%牛胎児血清、100  $\mu$ g/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、及び 250  $\mu$ g/mL-G418 (ナカライテスク社製)] で培養していた HEK293-EBNA (インビトロジェン社製) に導入した。

プラスミド導入後、そのまま 48 時間培養する (以下、血清培養と称する) か、あるいは、前記プラスミド導入後、そのまま 16 時間培養し、PBS で 2 回洗浄した後に、無血清培地 [DMEM (GIBCO-BRL 社)、100  $\mu$ g/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、250  $\mu$ g/mL-G418 (ナカライテスク社製)] にて 32 時間培養した (以下、無血清培養と称する)。

前記血清培養又は無血清培養で得られた各培養液を、遠心分離器(8800 型；久保田製作所社製)により遠心分離(3000rpm, 10 分間)することにより、培養上清を得た。また、前記培養液を除去した後に残った各細胞を、抽出液[20mmol/L-HEPES (pH7.4)、1%トリトン X-100、1%グリセロール、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)]にて15分間処理した後、ピペッティングにより細胞を培養プレートより剥離し、得られた細胞懸濁液を遠心分離器(8800 型；久保田製作所社製)により遠心分離(3000rpm, 10 分間)することにより、細胞膜結合画分(上清)と細胞画分(沈澱)とに分画した。

得られた各画分(すなわち、培養上清、細胞膜結合画分、及び細胞画分)における目的タンパク質の発現は、C 末端に付加した FLAG タグに対する抗体(マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 M2；シグマ社製)を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、前記の各画分を、2-ME を用いた還元条件下、SDS/10%~20% アクリルアミドゲル(第一化学薬品社製)を用いて電気泳動した後、ブロッティング装置を用いてポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロッキング剤(ブロックエース；大日本製薬社製)を添加してブロッキングした後、前記マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 M2 と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体(ザイメッド社製又はタゴ社製)とを、順次反応させた。あるいは、前記ブロッキングに続いて、ビオチン化 M2 抗体(シグマ社製)と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(アマシャムファルマシアバイオテク社製)とを、順次反応させた。反応後、市販のウエスタンブロッティング検出システム(ECL ウエスタンブロッティング検出システム；アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いて、目的タンパク質の発現を確認した。

プラスミド pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG を導入した細胞を無血清培養することにより得られた各画分において検出されたタンパク質(すなわち、MDTS9 短長タンパク質)の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)における見かけ上の分子質量は、培養上清において約 55~65KDa であり、細胞膜結合画分において約 55~65KDa であり、細胞画分において 80~95KDa であった。

#### 参考例 4 : MDS9 短長タンパク質のプロテアーゼ活性の確認

##### (1) プラスミド pCEPdE2-MDS9Cys2E/Q-FLAG の構築

クイックチェンジ・サイトダイレクテド・ミュータジェネシス・キット (QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit; ストラタジーン社製) を用い、添付の指示書に従って、活性中心と考えられる His-Glu-Ser-Gly-His (配列番号 12) の Glu (グルタミン酸) を Gln (グルタミン) に置換した遺伝子 MDS9Cys2E/Q を含有するプラスミド pZErO-MDS9Cys2E/Q を作製した。なお、鋳型としては、参考例 2 で作製したプラスミド pZErO-MDS9Cys2 を用い、プライマーセットとしては、配列番号 13 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号 14 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いた。

得られたプラスミド pZErO-MDS9Cys2E/Q を制限酵素 SpeI 及び NotI で切断して生成した約 2.3kbp の DNA 断片を、前記参考例 1 で構築したプラスミド pCEPdE2-FLAG の XbaI 及び NotI 部位に挿入することにより、プラスミド pCEPdE2-MDS9Cys2E/Q-FLAG を得た。

##### (2) $\alpha_2$ -マクログロブリンとの複合体形成を指標としたプロテアーゼ活性の確認

参考例 2 で作製したプラスミド pCEPdE2-MDS9Cys2-FLAG、参考例 4 (1) で作製したプラスミド pCEPdE2-MDS9Cys2E/Q-FLAG 又は、対照として、参考例 1 で作製したプラスミド pCEPdE2-FLAG でトランスフェクションした各細胞の血清培養の培養上清を、参考例 3 で示した手順と同様にして、2-ME を用いた還元条件下、SDS-PAGE し、PVDF 膜に転写した。転写後の PVDF 膜に、ブロッキング剤 (ブロックエース; 大日本製薬社製) を添加してブロッキングした後、ヤギ抗  $\alpha_2$ -マクログロブリン抗体 [セダーレーン (CEDARLANE) 社製] と、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギ IgG ポリクローナル抗体 [ザイメッド (Zymed Laboratories) 社製] とを、順次反応させた。反応後、市販のウエスタンブロッティング検出シス

テム (ECL ウェスタンブロッティング検出システム；アマシャムファルマシアバイオテク社製) を用いて、目的タンパク質の発現を確認した。

プラスミド pCEPdE2-MDTS9Cys2-FLAG でトランスフェクションした細胞由来の血清培養の培養上清では、プラスミド pCEPdE2-MDTS9Cys2E/Q-FLAG 又はプラスミド pCEPdE2-FLAG でトランスフェクションした細胞由来の各血清培養の培養上清で検出されない約 250KDa のバンドが検出された。この結果は、MDTS9 短長タンパク質 (MDTS9Cys2) が  $\alpha_2$ -マクログロブリンと複合体を形成したことを示しており、従って、MDTS9 短長タンパク質 (MDTS9Cys2) にプロテアーゼ活性があることが確認された。

#### 参考例 5：MDTS9 遺伝子の組織発現分布の確認

市販の cDNA パネル [Clontech 社製の Multiple Tissue cDNA (MTC™) Panel の内、Human MTC Panel I (カタログ番号：K1420-1)、Human MTC Panel II (カタログ番号：K1421-1)、Human Fetal MTC Panel (カタログ番号：K1425-1)、及び Human Tumor MTC Panel (カタログ番号：K1422-1)] を用いて、MDTS9 遺伝子の組織発現分布を以下の手順で解析した。

すなわち、配列番号 15 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号 16 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとの組み合わせをプライマーとし、前記 cDNA パネルを鋳型として、DNA ポリメラーゼ (TaKaRa LA Taq™；宝酒造社製) を用いて PCR を行なった。前記 PCR では、最初に 94°C (2 分間) で熱変性を行なった後、98°C (10 秒間) と 68°C (1 分 30 秒間) とからなるサイクルを 44 回繰り返した。続いて、反応液のアガロースゲル電気泳動を行ない、MDTS9 遺伝子の mRNA に由来する約 1.1kbp の DNA 断片を検出した。その結果、MDTS9 遺伝子の mRNA は、腎臓に発現していることが判明した。

#### 参考例 6：腎不全モデルにおける MDTS9 遺伝子の発現変動

##### (1) 鋳型 cDNA の調製

cDNA の調製は、ラット 5/6 腎摘モデル(木村健二郎, 「腎と透析」1991 臨時増刊号, 431-439)の腎臓より調製した。5/6 腎摘終了後、1 週、2 週、3 週、4 週、6 週、8 週、及び 10 週に、5/6 腎摘ラット及び偽手術ラットを各々5 匹ずつ解剖し、腎臓を摘出し、その後直ちに $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。これら各群の腎臓を液体窒素凍結下、細胞破碎機(クライオプレス CP-100; マイクロテック・ニチオン社製)を用いて破碎後、総 RNA 精製試薬(ISOGEN; 日本ジーン社製)を用いて総 RNA を調製した。抽出した総 RNA を DN アーゼ(ニッポンジーン社製)を用い、 $37^{\circ}\text{C}$ で 90 分間反応させた。DN アーゼ処理した総 RNA  $0.25\mu\text{g}$  をスーパースクリプト II ファーストストランドシステム(RT-PCR 用; GIBCO-BRL 社製)にて cDNA に変換した。

## (2) ラット腎不全モデルにおける MDTS9 遺伝子の発現変動

ラット腎不全モデルにおける腎臓での発現変動解析は、参考例 6 (1) で調製した cDNA を鋳型にして、シーケンスディテクター(Prism7700 Sequence Detector; アプライドバイオシステムズ社製)を用いて行なった。配列番号 30 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 31 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを、プライマーセットとして用いた。PCR は、市販の PCR 試薬 [サイバーグリーン PCR コアリエージェント (SYBR Green PCR core reagent); アプライドバイオシステムズ社製] を用い、 $95^{\circ}\text{C}$  (10 分間) の初期変性反応を実施した後、 $94^{\circ}\text{C}$  (15 秒間) と  $60^{\circ}\text{C}$  (30 秒間) と  $72^{\circ}\text{C}$  (60 秒間) とからなるサイクル反応を 45 回繰り返すことにより実施した。

また、内部標準としてヒトグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (G3PDH) の遺伝子発現量を算出するため、前記 cDNA を鋳型として、配列番号 32 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号 33 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとを、プライマーセットとして同条件の PCR を行なった。更に、mRNA 発現量算出に用いる標準曲線を得るために、ラットゲノム DNA (クロンテック社製) を鋳型として、前記プライマーセットを用いて同条件の PCR を行なった。各群における一定量の総 RNA 当たりのラット MDTS9 遺伝子の mRNA の発現量を比較するため、各条件でのラット MDTS9 遺伝子の mRNA の発現量は、各条件での

G3PDH 遺伝子発現量に対する割合で示した。その結果、ラット MDT S9 遺伝子の mRNA は、5/6 腎摘モデルにおいて、偽手術ラットに比べ、術後 1 週で約 5 倍の遺伝子が発現しており、尿タンパク質量が顕著に増加する術後 3 週、正常腎重量と比べ著明に腎重量が増加し始める術後 6 週、更に病態が悪化する術後 8 週で、それぞれ、約 2 倍の遺伝子が発現していることが判明した。

### (3) マウス 5/6 腎摘モデルにおける MDT S9 遺伝子の発現変動

マウス 5/6 腎摘モデルにおいても、参考例 6 (1) と同様に鋳型 cDNA を作成し、参考例 6 (2) と同様にラット MDT S9 カウンターパートの mRNA の定量を行った。蛋白尿及び病理組織切片の観察から、重症例と判断されるマウスに関して約 4 倍の遺伝子発現 (発現量の増加) が認められた。

本参考例により、腎不全モデルでは、MDT S9 の遺伝子が発現誘導されることが明らかとなった。

## 参考例 7 : ヒト腎臓組織切片の免疫組織染色

### (1) 抗ヒト MDT S9 抗体の作製

まず、実験解説書(岡田雅人及び宮崎香編, 「改訂タンパク質実験ノート」上, 羊土社, p. 162-179)に準じて、プラスミド pGEX-6P-1 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を発現ベクターとして用い、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 280 番~第 410 番のアミノ酸からなるペプチドと、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質 (GST-MDT S9A) を、大腸菌を用いて封入体画分に生産した。続いて、封入体画分について、調製用 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を実施し、ゲルから拡散法によって目的の GST-MDT S9A タンパク質を抽出した(岡田雅人及び宮崎香編, 「改訂タンパク質実験ノート」下, 羊土社, p. 48-51)。

得られた GST-MDT S9A タンパク質を、ウサギ(日本白色種)に 10~14 日間隔で計 5 回免疫した後、抗血清を調製した。この抗血清より、まず IgG 画分をプロテイ

ン G セファロース FF カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) でアフィニティー精製し、続いて、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 280 番～第 410 番のアミノ酸からなるペプチドと、マンノース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質 (MBP-MDTS9A) を固定したカラム (MBP-MDTS9A カラム) でアフィニティー精製を行ない、抗ヒト MDTS9 抗体とした。プロテイン G セファロース FF カラムでのアフィニティー精製、並びに CNBr 活性化セファロース FF カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) への MBP-MDTS9A の固定及び MBP-MDTS9A カラムでのアフィニティー精製は、添付説明書に従った。また、MBP-MDTS9A の大腸菌での生産及び精製は、pMAL-c2E (ニュー・イングランド・バイオラボ社製) を発現ベクターとして用い、同社の「pMAL 蛋白融合及び精製システム」の指示書に従った。

## (2) ヒト腎臓での MDTS9 タンパク質の検出

スライドガラス上にホルマリン固定及びパラフィン包埋した組織切片に、参考例 7 (1) で調製した抗ヒト MDTS9 抗体を反応させた後、市販の染色キット (ベクタステイン ABC-AP キット, カタログ番号 AK-5000 ; ベクター社製) を用いて、添付説明書に従い、染色した。その際、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ抗体 (カタログ番号 BA-1000 ; ベクター社製)、発色基質としてアルカリフォスファターゼ基質キット I (カタログ番号 SK-5100 ; ベクター社製) を用いた。その結果、健常人及び糖尿病性腎症 (初期又は後期) 患者の腎臓において、上皮細胞、中でも特に糸球体上皮細胞 (podocytes) での染色が認められた。

本参考例から、MDTS9 タンパク質がヒト腎臓で発現していることが明らかである。

## 実施例 1 : MDTS9 遺伝子 5' 上流域遺伝子のクローニング

ヒトゲノム DNA (Genomic DNA ; クロンテック社) を鋳型にし、配列番号 18 と配列番号 19 で示されるオリゴ DNA をプライマー、PyroBest™ DNA polymerase (宝酒造社) を DNA ポリメラーゼとして、97°C 3 分の後、96.5°C 30 秒、72°C 2 分のサイクルを 5 回、続いて 96.5°C 30 秒、70°C 2 分のサイクルを 5 回、続いて 96.5°C 30 秒、

68°C2分のサイクルを5回、続いて96.5°C30秒、63°C25秒、72°C2分のサイクルを25回、続いて72°C7分の条件でPCRを行い、生成した約2kbp断片をpZErO™-2.1(インビトロジェン社)のEcoRV認識部位にサブクローニングした。ここで得られたサブクローンの塩基配列を確認した結果、MTDS9遺伝子5'上流域の配列であることが確認でき、配列番号17の3253番目から5023番目で示される遺伝子であった。このサブクローンを鋳型、配列番号20と配列番号21で示されるオリゴDNAをプライマーとし、PyroBest™ DNA polymerase(宝酒造社)を用いて、95°C3分の後、97°C20秒、59°C30秒、72°C2分のサイクルを35回、続いて72°C3分の条件でPCRを行い、5'側に制限酵素SacI認識配列、3'側に制限酵素HindIII認識配列を導入した約1.8kbp断片を生成した。このDNA断片を制限酵素SacI、HindIII処理し、ルシフェラーゼアッセイシステム用ベクター(PicaGene Vector 2 ベーシックベクター; 東洋インキ社)のSacI、HindIII部位に挿入し、pGV-B2-MDTS9pro2kを得た。

また、5'側にMluI認識配列を付加した配列番号22で示されるオリゴDNAと配列番号23で示されたオリゴDNAのセットと、配列番号24と25で示されるオリゴDNAのセットをプライマー、ヒトゲノムDNA(Genomic DNA; クロンテック社)を鋳型とし、PyroBest™ DNA polymerase(宝酒造社)を用い、96°C2分の後、97°C20秒、60°C30秒、72°C1分のサイクルを40回、続いて72°C7分の条件でPCRを行なった。こうして生成した約600bp、1kbpの断片をpCR4Blunt-TOP0(インビトロジェン社)にサブクローニングし、サブクローンpCR4Blunt-TOP05k-1、pCR4Blunt-TOP05k-3を得た。また、配列番号26と27で示されるオリゴDNAのセット、配列番号28と29で示されるオリゴDNAのセットをプライマーとし、ヒトゲノムDNA(Genomic DNA; クロンテック社)を鋳型、PyroBest™ DNA polymerase(宝酒造社)を用い、96°C2分の後、97°C20秒、60°C30秒、72°C2分のサイクルを40回、続いて72°C7分の条件でPCRを行なった。こうして生成した約1.6kb、1.9kbの断片をpCR4Blunt-TOP0(インビトロジェン社)にサブクローニングし、サブクローンpCR4Blunt-TOP05k-2、pCR4Blunt-TOP05k-4を得た。pCR4Blunt-TOP05k-3をKpnI、SmaI処理して生成した約0.5kbpの断片とpCR4Blunt-TOP05k-4



を SmaI、EcoRI 処理して生成した約 1.5kbp の断片を連結し、pCR4Blunt-TOP0(インビトロジェン社)の KpnI、EcoRI 部位に挿入して pCR4Blunt-TOP05k-5 を得た。pCR4Blunt-TOP05k-1 を MluI、SphI 処理して得られる約 0.4kbp の断片、pCR4Blunt-TOP05k-2 を SphI、KpnI 処理して得られる約 1.5kbp の断片、pCR4Blunt-TOP05k-5 を KpnI、EcoRI 処理して得られる約 2.1kbp の断片を連結し、pGV-B2-MDTS9pro2k の MluI、EcoRI 部位に挿入し、pGV-B2-MDTS9pro5k を得た。ここで得られたサブクローンの塩基配列を確認した結果、配列番号 17 で示される遺伝子であった。

#### 実施例 2 : MDTS9 プロモーター領域 DNA 配列の解析

実施例 1 で得られたプラスミド pGV-B2-MDTS9pro2k 又は pGV-B2-MDTS9pro5k を参考例 3 に示す方法で HEK293-EBNA 細胞に導入し、そのまま、DMEM (GIBCO-BRL 社)、10%牛胎児血清、100  $\mu$ g/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、250  $\mu$ g/ml G418(ナカライテスク社製)で、48 時間培養を継続した後、PicaGene 発色キット(東洋インキ社)を用い、ルシフェラーゼ活性を測定した。この際、測定値は同時導入した  $\beta$ -gal 発現プラスミド(pCH110; アマシャムファルマシアバイオテック社)より発現した  $\beta$ -gal の活性値で補正した。 $\beta$ -gal 活性の測定は Galacto-Light Plus キット(TROPIX 社)を用いた。その結果、pGV-B2-MDTS9pro2k では約 27 倍の、及び pGV-B2-MDTS9pro5k では約 27~40 倍の、もとのプラスミドである pGV-B2 では認められないルシフェラーゼ活性の明らかな上昇が観察された。このことは上記 DNA 断片中にプロモーター活性が存在することを示している。

#### 実施例 3 : MDTS9 プロモーター領域 DNA 配列の TGF- $\beta$ 、IL-1 応答性

実施例 1 で得られたプラスミド pGV-B2-MDTS9pro5k を参考例 3 に示す方法で HEK293-EBNA 細胞に導入し、そのまま 16 時間培養した後、PBS で 2 回洗浄し、DMEM (GIBCO-BRL 社)、100  $\mu$ g/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、250  $\mu$ g/ml G418(ナカライテスク社)に置換し、6 時間培養した(以下、無血清培養)。続いて、TGF- $\beta$  (シグマ社製)又は IL-1(シグマ社製)を添加し、24 時間培養

後のルシフェラーゼ活性を測定した。測定値は、実施例 2 同様、 $\beta$ -gal の活性値で補正した。その結果、TGF- $\beta$  (1ng/ml) 添加により約 1.7 倍のルシフェラーゼ活性上昇が、IL-1 (1ng/ml) 添加により約 0.7 倍以下までルシフェラーゼ活性の減弱が観察された(図 1、図 2)。このことは上記 DNA 断片中に TGF- $\beta$  応答領域、IL-1 応答領域が存在することを示している。一方、pGV-B2-MDTS9pro2k を導入した細胞について、同様に、TGF- $\beta$  を添加してルシフェラーゼ活性を測定したところ、ルシフェラーゼ活性はコントロールと同等であった。

#### 産業上の利用可能性

本発明のプロモーターは、腎不全モデル動物において遺伝子発現量が増加しており、TGF- $\beta$  により誘導され、IL-1 により阻害され、細胞外マトリクスの代謝に関与する、ヒトの腎臓に発現しているプロテアーゼ MDTS9 のプロモーターであるので、本発明のプロモーターの活性を阻害する物質は、TGF- $\beta$  の生理作用のうち、細胞外マトリクス成分の質的変化及び量的増加に関わる部分だけを抑制又は阻害し、長期投与が想定される慢性腎不全治療及び／又は予防剤として有用である。したがって、本発明のプロモーターであるポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞は、慢性腎不全治療及び／又は予防剤のスクリーニングツールとして有用であり、本発明のプロモーターであるポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞を用い、慢性腎不全治療及び／又は予防剤のスクリーニングが可能である。また、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の品質規格の確認試験における本発明のプロテアーゼの活性を阻害するか否かを分析する工程、及び製剤化工程を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造も可能とした。

#### 配列表フリーテキスト

以下の配列表の数字見出し< 2 2 3 >には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号 3 及び 4 の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したリンカー配列である。また、配列表の配列番号 5 ~ 9、13 及び 14、及び 20 ~ 22 の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成した

プライマー配列である。更に、配列表の配列番号 11 の配列で表されるアミノ酸配列は、制限酵素 NotI 認識ヌクレオチド配列及び FLAG タグアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む DNA の発現により得られるアミノ酸配列である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号17の3253番目から5023番目で表される塩基配列、あるいは、配列番号17の3253番目から5023番目で表される塩基配列の中において、1～10個の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含み、配列番号2記載のポリペプチドのプロモーター活性を有するポリヌクレオチド。
2. 配列番号17で表される塩基配列、あるいは、配列番号17記載の塩基配列の中において、1～10個の塩基が置換、欠失、及び／又は挿入されている塩基配列を含む、請求項1記載のポリヌクレオチド。
3. 配列番号17の3253番目から5023番目で表される塩基配列、又は、配列番号17で表される塩基配列を含む、請求項1記載のポリヌクレオチド。
4. 請求項1乃至請求項3記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
5. 請求項4記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞。
6. 請求項1記載のポリヌクレオチド、又は、請求項5記載の細胞からなる慢性腎不全治療及び／又は予防用物質スクリーニングツール。
7. 請求項1記載のポリヌクレオチド、又は、請求項5記載の細胞の慢性腎不全治療及び／又は予防用物質スクリーニングのための使用。
8. (1) 請求項5記載の細胞と、試験化合物とを接触させる工程、及び(2) プロモーター活性を検出する工程を含む、試験化合物が請求項1乃至請求項3記載のポリヌクレオチドのプロモーター活性を阻害するか否かを分析する方法。
9. 請求項8記載の方法による分析工程、及びプロモーター活性を阻害する物質を選択する工程を含む、配列番号2記載のポリペプチドの発現を抑制する物質をスクリーニングする方法。
10. 請求項9記載の方法により、慢性腎不全治療及び／又は予防用物質をスクリーニングする方法。
11. 請求項8記載の方法による分析工程、及び製剤化工程を含む、慢性腎不全治療及び／又は予防用医薬組成物の製造方法。

1 / 1

Fig 1

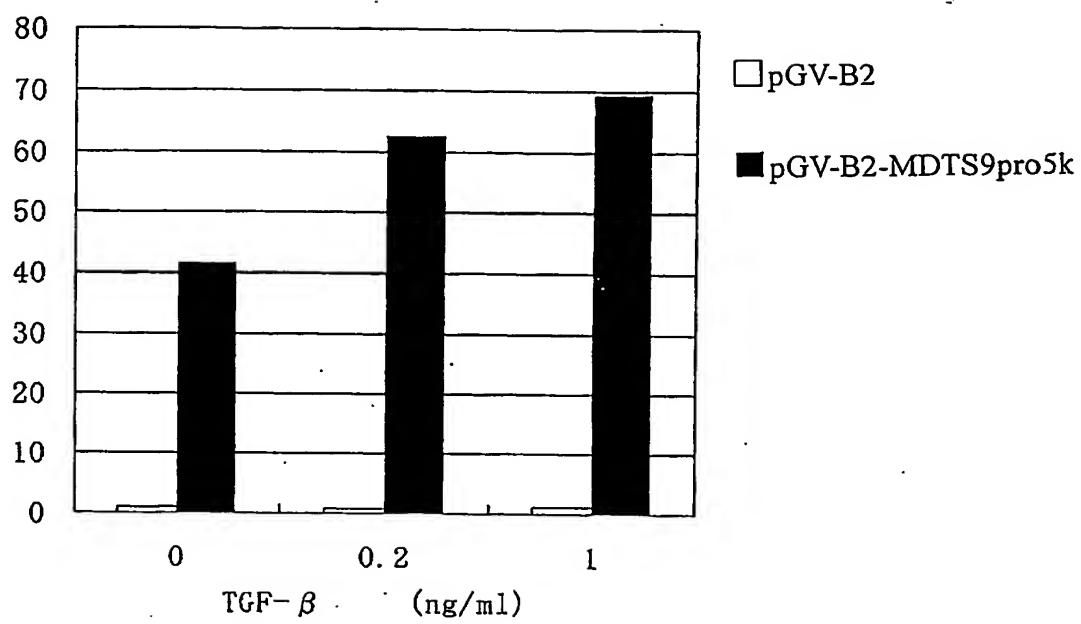
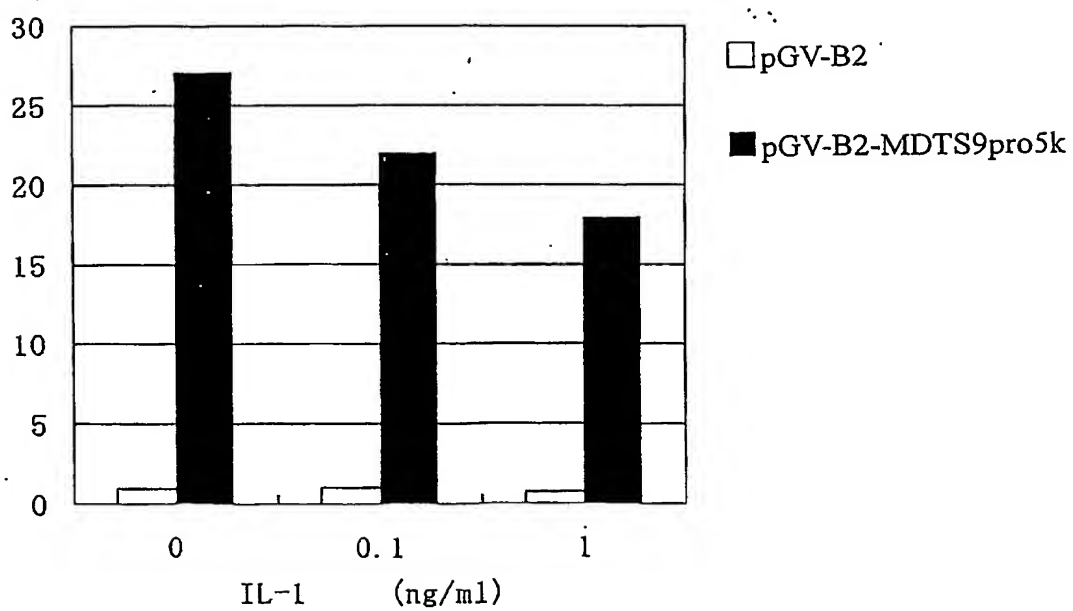


Fig 2



1/26

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

&lt;120&gt; Novel promoter

&lt;130&gt; Y0322-PCT

&lt;150&gt; JP2002-180543

&lt;151&gt; 2002-06-20

&lt;160&gt; 33

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3675

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (3675)

&lt;400&gt; 1

atg	aag	ccc	cgc	gcg	cgc	gga	tgg	cgg	ggc	ttg	gcg	gcg	ctg	tgg	atg	48
Met	Lys	Pro	Arg	Ala	Arg	Gly	Trp	Arg	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Trp	Met	
1				5					10					15		

ctg	ttg	gcg	cag	gtg	gcc	gag	cag	gca	cct	gcg	tgc	gcc	atg	gga	ccc	96
Leu	Leu	Ala	Gln	Val	Ala	Glu	Gln	Ala	Pro	Ala	Cys	Ala	Met	Gly	Pro	
			20					25					30			

gca	gcg	gca	gcg	cct	ggg	agc	ccg	agc	gtc	cgc	cgt	cct	cct	cca	ccc	144
Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Ser	Val	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	
			35					40						45		

2/26

gcg gag cgg cgg ggc tgg atg gaa aag ggc gaa tat gac ctg gtc tct	192
Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser	
50 55 60	
gcc tac gag gtt gac cac agg ggc gat tac gtg tcc cat gaa atc atg	240
Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met	
65 70 75 80	
cac cat cag cgg cgg aga aga gca gtg gcc gtg tcc gag gtt gag tct	288
His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser	
85 90 95	
ctt cac ctt cgg ctg aaa ggc tcc agg cac gac ttc cac gtg gat ctg	336
Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Ser Arg His Asp Phe His Val Asp Leu	
100 105 110	
agg act tcc agc agc cta gtg gct cct ggc ttt att gtg cag acg ttg	384
Arg Thr Ser Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu	
115 120 125	
gga aag aca ggc act aag tct gtg cag act tta ccg cca gag gac ttc	432
Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe	
130 135 140	
tgt ttc tat caa ggc tct ttg cga tca cac aga aac tcc tca gtg gcc	480
Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala	
145 150 155 160	
ctt tca acc tgc caa ggc ttg tca ggc atg ata cga aca gaa gag gca	528
Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala	
165 170 175	
gat tac ttc cta agg cca ctt cct tca cac ctc tca tgg aaa ctc ggc	576
Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly	
180 185 190	

3/26

aga gct gcc caa ggc agc tog cca tcc cac gta ctg tac aag aga tcc	624
Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser	
195 200 205	
aca gag ccc cat gct cct ggg gcc agt gag gtc ctg gtg acc tca agg	672
Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg	
210 215 220	
aca tgg gag ctg goa cat caa ccc ctg cac agc agc gac ott cgc ctg	720
Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu	
225 230 235 240	
gga ctg cca caa aag cag cat ttc tgt gga aga cgc aag aaa tac atg	768
Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met	
245 250 255	
ccc cag cct ccc aag gaa gac ctc ttc atc ttg cca gat gag tat aag	816
Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys	
260 265 270	
tct tgc tta cgg cat aag cgc tct ott ctg agg tcc cat aga aat gaa	864
Ser Cys Leu Arg His Lys Arg Ser Leu Leu Arg Ser His Arg Asn Glu	
275 280 285	
gaa ctg aac gtg gag acc ttg gtg gtg gtc gac aaa aag atg atg caa	912
Glu Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Val Asp Lys Lys Met Met Gln	
290 295 300	
aac cat ggc cat gaa aat atc acc acc tac gtg ctc acg ata ctc aac	960
Asn His Gly His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr Val Leu Thr Ile Leu Asn	
305 310 315 320	
atg gta tct gct tta ttc aaa gat gga aca ata gga gga aac atc aac	1008
Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Gly Asn Ile Asn	
325 330 335	



4/26

att gca att gta ggt ctg att ctt cta gaa gat gaa cag cca gga ctg 1056  
 Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu Asp Glu Gln Pro Gly Leu  
                   340                  345                  350

gtg ata agt cac cac gca gac cac acc tta agt agc ttc tgc cag tgg 1104  
 Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu Ser Ser Phe Cys Gln Trp  
                   355                  360                  365

cag tct gga ttg atg ggg aaa gat ggg act cgt cat gac cac gcc atc 1152  
 Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr Arg His Asp His Ala Ile  
                   370                  375                  380

tta ctg act ggt ctg gat ata tgt tcc tgg aag aat gag ccc tgt gac 1200  
 Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp  
                   385                  390                  395                  400

act ttg gga ttt gca ccc ata agt gga atg tgt agt aaa tat cgc agc 1248  
 Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser  
                   405                  410                  415

tgc acg att aat gaa gat aca ggt ctt gga ctg gcc ttc acc att gcc 1296  
 Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala  
                   420                  425                  430

cat gag tct gga cac aac ttt ggc atg att cat gat gga gaa ggg aac 1344  
 His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn  
                   435                  440                  445

atg tgt aaa aag tcc gag ggc aac atc atg tcc cct aca ttg gca gga 1392  
 Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly  
                   450                  455                  460

cgc aat gga gtc ttc tcc tgg tca ccc tgc agc cgc cag tat cta cac 1440  
 Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His  
                   465                  470                  475                  480

5/26

aaa ttt cta agc acc gct caa gct atc tgc ctt gct gat cag cca aag	1488
Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys	
485 490 495	
cct gtg aag gaa tac aag tat cct gag aaa ttg cca gga gaa tta tat	1536
Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr	
500 505 510	
gat gca aac aca cag tgc aag tgg cag ttc gga gag aaa gcc aag ctc	1584
Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu	
515 520 525	
tgc atg ctg gac ttt aaa aag gac atc tgt aaa gcc ctg tgg tgc cat	1632
Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His	
530 535 540	
cgt att gga agg aaa tgt gag act aaa ttt atg cca gca gca gaa ggc	1680
Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly	
545 550 555 560	
aca att tgt ggg cat gac atg tgg tgc cgg gga gga cag tgt gtg aaa	1728
Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys	
565 570 575	
tat ggt gat gaa ggc ccc aag ccc acc cat ggc cac tgg tcg gac tgg	1776
Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp	
580 585 590	
tct tct tgg tcc cca tgc tcc agg acc tgc gga ggg gga gta tct cat	1824
Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Ser His	
595 600 605	
agg agt cgc ctc tgc acc aac ccc aag cca tcg cat gga ggg aag ttc	1872
Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe	
610 615 620	

6/26

tgt gag ggc tcc act cgc act ctg aag ctc tgc aac agt cag aaa tgt 1920  
Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys  
625 630 635 640

ccc cgg gac agt gtt gac ttc cgt gct gct cag tgt gcc gag cac aac 1968  
Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala Gln Cys Ala Glu His Asn  
645 650 655

agc aga cga ttc aga ggg cgg cac tac aag tgg aag cct tac act caa 2016  
Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln  
660 665 670

gta gaa gat cag gac tta tgc aaa ctc tac tgt atc gca gaa gga ttt 2064  
Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe  
675 680 685

gat ttc ttc ttt tct ttg tca aat aaa gtc aaa gat ggg act cca tgc 2112  
Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys  
690 695 700

tcg gag gat agc cgt aat gtt tgt ata gat ggg ata tgt gag aga gtt	2160
Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val	
705	710
	715
	720

gga tgt gac aat gtc ctt gga tct gat gct gtt gaa gac gtc tgt ggg 2208  
Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly  
725 730 735

gtg tgt aac ggg aat aac tca gcc tgc acg att cac agg ggt ctc tac 2256  
Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr  
740 745 750

acc aag cac cac cac acc aac cag tat tat cac atg gtc acc att cct 2304  
Thr Lys His His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro  
755 760 765

7/26

tct gga gcc cgg agt atc cgc atc tat gaa atg aac gtc tct acc tcc 2352  
 Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser  
 770 775 780

tac att tct gtg cgc aat gcc ctc aga agg tac tac ctg aat ggg cac 2400  
 Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His  
 785 790 795 800

tgg acc gtg gac tgg ccc ggc cgg tac aaa ttt tcg ggc act act ttc 2448  
 Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe  
 805 810 815

gac tac aga cgg tcc tat aat gag ccc gag aac tta atc gct act gga 2496  
 Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly  
 820 825 830

cca acc aac gag aca ctg att gtg gag ctg ctg ttt cag gga agg aac 2544  
 Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn  
 835 840 845

ccg ggt gtt gcc tgg gaa tac tcc atg cct cgc ttg ggg acc gag aag 2592  
 Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys  
 850 855 860

cag ccc cct gcc cag ccc agc tac act tgg gcc atc gtg cgc tct gag 2640  
 Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu  
 865 870 875 880

tgc tcc gtg tcc tgc gga ggg gga cag atg acc gtg aga gag ggc tgc 2688  
 Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys  
 885 890 895

tac aga gac ctg aag ttt caa gta aat atg tcc ttc tgc aat ccc aag 2736  
 Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys  
 900 905 910

8/26

aca cga cct gtc acg ggg ctg gtg cct tgc aaa gta tct gcc tgt cct	2784
Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro	
915 920 925	
ccc agc tgg tcc gtg ggg aac tgg agt gcc tgc agt cgg acg tgt ggc	2832
Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly	
930 935 940	
ggg ggt gcc cag agc cgc ccc gtg cag tgc aca cgg cgg gtg cac tat	2880
Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr	
945 950 955 960	
gac tgc gag cca gtc ccg gcc agc ctg tgc cct cag cct gct ccc tcc	2928
Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser	
965 970 975	
agc agg cag gcc tgc aac tct cag agc tgc cca cct gca tgg agc gcc	2976
Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala	
980 985 990	
ggg ccc tgg gca gag tgc tca cac acc tgt ggg aag ggg tgg agg aag	3024
Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys	
995 1000 1005	
cgg gca gtg gcc tgt aag agc acc aac ccc tgc gcc aga gcg cag ctg	3072
Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu	
1010 1015 1020	
ctg ccc gac gct gtc tgc acc tcc gag ccc aag ccc agg atg cat gaa	3120
Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu	
1025 1030 1035 1040	
gcc tgt ctg ctt cag cgc tgc cac aag ccc aag aag ctg cag tgg ctg	3168
Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu	
1045 1050 1055	

9/26

gtg tcc gcc tgg tcc cag tgc tct gtg aca tgt gaa aga gga aca cag 3216  
 Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln  
 1060 1065 1070

aaa aga ttc tta aaa tgt gct gaa aag tat gtt tct gga aag tat cga 3264  
 Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg  
 1075 1080 1085

gag ctg gcc tca aag aag tgc tca cat ttg ccg aag ccc agc ctg gag 3312  
 Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu  
 1090 1095 1100

ctg gaa cgt gcc tgc gcc ccg ctt cca tgc ccc agg cac ccc cca ttt 3360  
 Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe  
 1105 1110 1115 1120

gct gct gcg gga ccc tcg agg ggc agc tgg ttt gcc tca ccc tgg tct 3408  
 Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser  
 1125 1130 1135

cag tgc acg gcc agc tgt ggg gga ggc gtt cag acg agg tcc gtg cag 3456  
 Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln  
 1140 1145 1150

tgc ctg gct ggg ggc cgg ccg gcc tca ggc tgc ctc ctg cac cag aag 3504  
 Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys  
 1155 1160 1165

cct tcg gcc tcc ctg gcc tgc aac act cac ttc tgc ccc att gca gag 3552  
 Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu  
 1170 1175 1180

aag aaa gat gcc ttc tgc aaa gac tac ttc cac tgg tgc tac ctg gta 3600  
 Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val  
 1185 1190 1195 1200

10/26

ccc cag cac ggg atg tgc agc cac aag ttc tac ggc aag cag tgc tgc 3648  
 Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys  
                   1205                  1210                  1215

aag act tgc tct aag tcc aac ttg tga 3675  
 Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu  
                   1220                  1225

<210> 2  
 <211> 1224  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Lys Pro Arg Ala Arg Gly Trp Arg Gly Leu Ala Ala Leu Trp Met  
   1                  5                  10                  15  
 Leu Leu Ala Gln Val Ala Glu Gln Ala Pro Ala Cys Ala Met Gly Pro  
                   20                  25                  30  
 Ala Ala Ala Ala Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Pro Pro Pro Pro  
                   35                  40                  45  
 Ala Glu Arg Pro Gly Trp Met Glu Lys Gly Glu Tyr Asp Leu Val Ser  
                   50                  55                  60  
 Ala Tyr Glu Val Asp His Arg Gly Asp Tyr Val Ser His Glu Ile Met  
   65                  70                  75                  80  
 His His Gln Arg Arg Arg Arg Ala Val Ala Val Ser Glu Val Glu Ser  
                   85                  90                  95  
 Leu His Leu Arg Leu Lys Gly Ser Arg His Asp Phe His Val Asp Leu  
                   100                  105                  110  
 Arg Thr Ser Ser Ser Leu Val Ala Pro Gly Phe Ile Val Gln Thr Leu  
                   115                  120                  125  
 Gly Lys Thr Gly Thr Lys Ser Val Gln Thr Leu Pro Pro Glu Asp Phe  
                   130                  135                  140  
 Cys Phe Tyr Gln Gly Ser Leu Arg Ser His Arg Asn Ser Ser Val Ala  
   145                  150                  155                  160

11/26

Leu Ser Thr Cys Gln Gly Leu Ser Gly Met Ile Arg Thr Glu Glu Ala  
 165 170 175  
 Asp Tyr Phe Leu Arg Pro Leu Pro Ser His Leu Ser Trp Lys Leu Gly  
 180 185 190  
 Arg Ala Ala Gln Gly Ser Ser Pro Ser His Val Leu Tyr Lys Arg Ser  
 195 200 205  
 Thr Glu Pro His Ala Pro Gly Ala Ser Glu Val Leu Val Thr Ser Arg  
 210 215 220  
 Thr Trp Glu Leu Ala His Gln Pro Leu His Ser Ser Asp Leu Arg Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Pro Gln Lys Gln His Phe Cys Gly Arg Arg Lys Lys Tyr Met  
 245 250 255  
 Pro Gln Pro Pro Lys Glu Asp Leu Phe Ile Leu Pro Asp Glu Tyr Lys  
 260 265 270  
 Ser Cys Leu Arg His Lys Arg Ser Leu Leu Arg Ser His Arg Asn Glu  
 275 280 285  
 Glu Leu Asn Val Glu Thr Leu Val Val Val Asp Lys Lys Met Met Gln  
 290 295 300  
 Asn His Gly His Glu Asn Ile Thr Thr Tyr Val Leu Thr Ile Leu Asn  
 305 310 315 320  
 Met Val Ser Ala Leu Phe Lys Asp Gly Thr Ile Gly Gly Asn Ile Asn  
 325 330 335  
 Ile Ala Ile Val Gly Leu Ile Leu Leu Glu Asp Glu Gln Pro Gly Leu  
 340 345 350  
 Val Ile Ser His His Ala Asp His Thr Leu Ser Ser Phe Cys Gln Trp  
 355 360 365  
 Gln Ser Gly Leu Met Gly Lys Asp Gly Thr Arg His Asp His Ala Ile  
 370 375 380  
 Leu Leu Thr Gly Leu Asp Ile Cys Ser Trp Lys Asn Glu Pro Cys Asp  
 385 390 395 400  
 Thr Leu Gly Phe Ala Pro Ile Ser Gly Met Cys Ser Lys Tyr Arg Ser  
 405 410 415  
 Cys Thr Ile Asn Glu Asp Thr Gly Leu Gly Leu Ala Phe Thr Ile Ala  
 420 425 430  
 His Glu Ser Gly His Asn Phe Gly Met Ile His Asp Gly Glu Gly Asn  
 435 440 445



12/26

Met Cys Lys Lys Ser Glu Gly Asn Ile Met Ser Pro Thr Leu Ala Gly  
 450 455 460  
 Arg Asn Gly Val Phe Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Gln Tyr Leu His  
 465 470 475 480  
 Lys Phe Leu Ser Thr Ala Gln Ala Ile Cys Leu Ala Asp Gln Pro Lys  
 485 490 495  
 Pro Val Lys Glu Tyr Lys Tyr Pro Glu Lys Leu Pro Gly Glu Leu Tyr  
 500 505 510  
 Asp Ala Asn Thr Gln Cys Lys Trp Gln Phe Gly Glu Lys Ala Lys Leu  
 515 520 525  
 Cys Met Leu Asp Phe Lys Lys Asp Ile Cys Lys Ala Leu Trp Cys His  
 530 535 540  
 Arg Ile Gly Arg Lys Cys Glu Thr Lys Phe Met Pro Ala Ala Glu Gly  
 545 550 555 560  
 Thr Ile Cys Gly His Asp Met Trp Cys Arg Gly Gly Gln Cys Val Lys  
 565 570 575  
 Tyr Gly Asp Glu Gly Pro Lys Pro Thr His Gly His Trp Ser Asp Trp  
 580 585 590  
 Ser Ser Trp Ser Pro Cys Ser Arg Thr Cys Gly Gly Gly Val Ser His  
 595 600 605  
 Arg Ser Arg Leu Cys Thr Asn Pro Lys Pro Ser His Gly Gly Lys Phe  
 610 615 620  
 Cys Glu Gly Ser Thr Arg Thr Leu Lys Leu Cys Asn Ser Gln Lys Cys  
 625 630 635 640  
 Pro Arg Asp Ser Val Asp Phe Arg Ala Ala Gln Cys Ala Glu His Asn  
 645 650 655  
 Ser Arg Arg Phe Arg Gly Arg His Tyr Lys Trp Lys Pro Tyr Thr Gln  
 660 665 670  
 Val Glu Asp Gln Asp Leu Cys Lys Leu Tyr Cys Ile Ala Glu Gly Phe  
 675 680 685  
 Asp Phe Phe Phe Ser Leu Ser Asn Lys Val Lys Asp Gly Thr Pro Cys  
 690 695 700  
 Ser Glu Asp Ser Arg Asn Val Cys Ile Asp Gly Ile Cys Glu Arg Val  
 705 710 715 720  
 Gly Cys Asp Asn Val Leu Gly Ser Asp Ala Val Glu Asp Val Cys Gly  
 725 730 735

13/26

Val Cys Asn Gly Asn Asn Ser Ala Cys Thr Ile His Arg Gly Leu Tyr  
 740 745 750  
 Thr Lys His His His Thr Asn Gln Tyr Tyr His Met Val Thr Ile Pro  
 755 760 765  
 Ser Gly Ala Arg Ser Ile Arg Ile Tyr Glu Met Asn Val Ser Thr Ser  
 770 775 780  
 Tyr Ile Ser Val Arg Asn Ala Leu Arg Arg Tyr Tyr Leu Asn Gly His  
 785 790 795 800  
 Trp Thr Val Asp Trp Pro Gly Arg Tyr Lys Phe Ser Gly Thr Thr Phe  
 805 810 815  
 Asp Tyr Arg Arg Ser Tyr Asn Glu Pro Glu Asn Leu Ile Ala Thr Gly  
 820 825 830  
 Pro Thr Asn Glu Thr Leu Ile Val Glu Leu Leu Phe Gln Gly Arg Asn  
 835 840 845  
 Pro Gly Val Ala Trp Glu Tyr Ser Met Pro Arg Leu Gly Thr Glu Lys  
 850 855 860  
 Gln Pro Pro Ala Gln Pro Ser Tyr Thr Trp Ala Ile Val Arg Ser Glu  
 865 870 875 880  
 Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Gln Met Thr Val Arg Glu Gly Cys  
 885 890 895  
 Tyr Arg Asp Leu Lys Phe Gln Val Asn Met Ser Phe Cys Asn Pro Lys  
 900 905 910  
 Thr Arg Pro Val Thr Gly Leu Val Pro Cys Lys Val Ser Ala Cys Pro  
 915 920 925  
 Pro Ser Trp Ser Val Gly Asn Trp Ser Ala Cys Ser Arg Thr Cys Gly  
 930 935 940  
 Gly Gly Ala Gln Ser Arg Pro Val Gln Cys Thr Arg Arg Val His Tyr  
 945 950 955 960  
 Asp Ser Glu Pro Val Pro Ala Ser Leu Cys Pro Gln Pro Ala Pro Ser  
 965 970 975  
 Ser Arg Gln Ala Cys Asn Ser Gln Ser Cys Pro Pro Ala Trp Ser Ala  
 980 985 990  
 Gly Pro Trp Ala Glu Cys Ser His Thr Cys Gly Lys Gly Trp Arg Lys  
 995 1000 1005  
 Arg Ala Val Ala Cys Lys Ser Thr Asn Pro Ser Ala Arg Ala Gln Leu  
 1010 1015 1020

14/26

Leu Pro Asp Ala Val Cys Thr Ser Glu Pro Lys Pro Arg Met His Glu  
 1025 1030 1035 1040  
 Ala Cys Leu Leu Gln Arg Cys His Lys Pro Lys Lys Leu Gln Trp Leu  
 1045 1050 1055  
 Val Ser Ala Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Glu Arg Gly Thr Gln  
 1060 1065 1070  
 Lys Arg Phe Leu Lys Cys Ala Glu Lys Tyr Val Ser Gly Lys Tyr Arg  
 1075 1080 1085  
 Glu Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ser His Leu Pro Lys Pro Ser Leu Glu  
 1090 1095 1100  
 Leu Glu Arg Ala Cys Ala Pro Leu Pro Cys Pro Arg His Pro Pro Phe  
 1105 1110 1115 1120  
 Ala Ala Ala Gly Pro Ser Arg Gly Ser Trp Phe Ala Ser Pro Trp Ser  
 1125 1130 1135  
 Gln Cys Thr Ala Ser Cys Gly Gly Gly Val Gln Thr Arg Ser Val Gln  
 1140 1145 1150  
 Cys Leu Ala Gly Gly Arg Pro Ala Ser Gly Cys Leu Leu His Gln Lys  
 1155 1160 1165  
 Pro Ser Ala Ser Leu Ala Cys Asn Thr His Phe Cys Pro Ile Ala Glu  
 1170 1175 1180  
 Lys Lys Asp Ala Phe Cys Lys Asp Tyr Phe His Trp Cys Tyr Leu Val  
 1185 1190 1195 1200  
 Pro Gln His Gly Met Cys Ser His Lys Phe Tyr Gly Lys Gln Cys Cys  
 1205 1210 1215  
 Lys Thr Cys Ser Lys Ser Asn Leu  
 1220

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: an

15/26

artificially synthesized linker sequence

&lt;400&gt; 3

ctagcgcggc cgcaggatcc gactacaagg acgacgatga caaatgataa

50

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized linker sequence

&lt;400&gt; 4

gatcttatca tttgtcatcg tcgtccttgt agtcggatcc tgcggccgcg

50

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 5

ggactagtct agaagctggg taccagctgc tagc

34

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence



16/26

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 6

ggactagtgt cgaccgggtca tggctgcgc

29

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 7

ggactagtgc catgggaccc gcagcggcag cgocctggg

38

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 8

gggcggccgc acccctgtga atcgtgcagg ctgagttatt

40

&lt;210&gt; 9

17/26

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 9

ggactagtag catgaagccc cgcgcgcgcg gatggcgggg c

41

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

ccctgtggtc aacctcgtag gcagagacca

30

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an amino acid  
sequence obtained by expression of a DNA containing a  
restriction enzyme NotI recognition nucleotide sequence and a  
nucleotide sequence encoding a FLAG tag amino acid sequence

&lt;400&gt; 11

Ala Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1

5

10

18/26

<210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
His Glu Ser Gly His  
1 5

<210> 13  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

<400> 13  
tggccttcac cattgcccat cagtctggac acaactttgg c 41

<210> 14  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

<400> 14  
gccaaagttg tgtccagact gatgggcaat ggtgaaggcc a 41

19/26

<210> 15  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
caccttaagt agcttctgcc agtggcagtc t 31

<210> 16  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
acaaacatta cggctatcct ccgagcatgg ag 32

<210> 17  
<211> 5023  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 17  
atatgaacta caaaaatttt gcacacaatc attgtaattt tttccactaa agacaagtgt 60  
tgatgcacaa tacaatgcta ctttctttga aacctgacta gtttcagctg tgtgtgagat 120  
gaggaaggaa caaaattaca gactaaacag aatctttgta gggcacaaac acatccaatt 180  
cttctctgtt tcggttgat ggatgggtgtt ttacataca aggtaatgtg cccacttgca 240  
ctgctttagt ttaaagttta tgcaatttag aaaagggtta tgacaaagtt tggtcctttt 300  
aatctaaaat gccatttggt tccacatgag aaagggccct ggctcctttc attgtgaaag 360  
ggcactgggc atgggagagc atgcagccgt tagaagaaac tctctctcag atcctttgct 420  
aagcactttg tttttatttt taatttaatt tttattctct attgaaacgt ctacttgata 480  
ttcaaaatga cctaagtaat cagaacctct gtctgaaagg aaacaagtgc taactgtgaa 540  
tggtctaaat aatttacagc aacatttttc tgtgaagggc cagatggtaa atagtttagg 600  
ctttgcaggg cacacagtct ctgttgcaat gacttaactc tgccattgtg aaagcattca 660



20/26

cagacgatct gcaaacaaat aaaactttat ttacaaaatg agtcagctgg ccagatttga 720  
tcttaggcag tagagagttt tctgaccctg gatgtaaaca aatgatgaca aaactgcttt 780  
cctaaacttt gacctcaaag ttaagagtgc taagttcttg aagggtgca aagtgaagta 840  
gtttgaggct ggcggtttgt tttgactctt ccaatatttg ttctcagggt tactttgctg 900  
ggacaccttt aaactgaagg gactccatat acatatattg atttccattt tacctttaaa 960  
aattaggcag gtctgggtccc caatactgta tggcaccaac ccattgcgct gccactcagt 1020  
gccaggagtc ccttttaagg cagacacgtg tgctccagtt tgcccctccc tctccatccc 1080  
tccttgagac ggacaggcag ctgcgagtta ctgccaccat gttagatggc cagtcttaaa 1140  
ctcgggtccac tcgtgtgttt tgcatctcag ctcccactct ggccctctata gcctggactc 1200  
aaccacccct ctttgttacc tggagacatt catactgcag gatgagcgt gaaatccgtg 1260  
caccgctaga ggaactggga aacactagtc attttaaaga atgttgtttc tttcttcaca 1320  
atgaaaagag actcatttag cactgctctg gtcttactgt tcttaagcat accgtaagag 1380  
tgaatccttt tatatcagcc attcttcttt ttttccatct gtttgaactt acagaagagg 1440  
gcccctaggt atctccatgt gatagactgg aaaaaatctc actcccttc atgttacact 1500  
ggacacaatt agaagtacgt agagatcccc atttatcaag cgtgcaatgt actcaggaca 1560  
agggaaattc tgccggcaga ttctggagac ttccaggcac tgccgaacct ccccttcaag 1620  
gtaagtgtaa gctccctgag gtgtgagctg aggacagcg ttgttaggca ttggcagaga 1680  
ggaagggtgg caggtgtttt aaggctccctc ccaatgccag gctttatgta aaaaatattt 1740  
gcactttgag gaatggtttc aaataaatga ataagagagg gagtgtgtgt tgctatggaa 1800  
tgaggatgcc catacacagc caggcggttc tactgcccct acctgggggtc tggggcttca 1860  
ggacagccct agcagggcgc ctgotgggag ctctccctgg gtaccacag actcgcgaca 1920  
ggctgggcaa agaaagccag agcccaagac accatttccc ccattcatcc cctcttccaa 1980  
agtgtgcaaa agaggcaacg tcaagctaag ctggctgtga aggacactgg aaccaaacaa 2040  
agggcagctg aaggcccagg atccacataa ggtgtgtgat gggaaagcag ccacggatgg 2100  
ggagcgccac acacacacac gtgtgcaaac atgcactccc acgcgcgcag tcctactgag 2160  
aggtgacagc gtgctggcag tcctcagagc cctcgttgc tctgggcacc tcccctgcct 2220  
gggctccgac tttggcggca tttgaggagc ccttcagctc cccactgcac tgtgggagcc 2280  
cctttctggg ctggccaagg ctggagccca ctccctcagc ttgcaggag gtgtggaggg 2340  
agaggcacga gcgggaaccg gggctgcgtg cagcgttgc gggccagctg gagttccggg 2400  
tggcggtggg cttggcgggc ccgcactca gagcagccgg ccagccctgc tggccccggg 2460  
caatgaggga cttagcacct gggccagtgg ctgcggaggg tgtactgggt cccccagcag 2520  
tgccggccca ccggggctgt gctcgatttc ttgccgagcc ttagctgcct tcctgcgggg 2580  
cagggtcgg gacctgcagc ccgcatgcc tgagcctccc accactcca tgggctcctg 2640  
tgccggccga gcctcccaa ggagcgccac cccctgctcc acagcgccca gtcccatgga 2700  
ccaccaagg gctgaggaat gcgagcgcac ggcgcaggac tggcaggcag ctccacctgc 2760  
gccccggtgc ggggatccac taggtgaagc cagctgggat cctgagctct gtggggatgt 2820

21/26

ggagagtott tatgtctago tcagggattg taaatacacc aatcagcacc ctgtgttttag 2880  
ctcaaggttt gtgagtgcac caatcgatac tctgtatcta gctgctctgg tggggccttg 2940  
gagaacctgt gtgtggaaac tctgtgtatc taactaatct gatggggacg tggagaacct 3000  
ttgtatctag ctcagggatg gtaaacgcac caatcagcgc cctgacaaaa caggccactc 3060  
ggctctacca atcagcagga tgtcgctagg gccagataag agaataaaaag caggctgccc 3120  
cagccagccg tggcaaccgg ctcaggctcc cttccatgct gtggaagctt tgttcttttg 3180  
ctttttgcaa taaatcttac tactgctcac tctttttttt tttttttttt tttttttttt 3240  
tgagacggag tctcgctctg tcgcccaggc tggagtgcag tggcgggacg tcggctcact 3300  
gcaagctccg cctcccgggt tcacgccatt ctctgcctc agcctcccaa gtagctggga 3360  
ctacaggcgc ccgccactac gcccgctctaa ttttttgtat ttttagtaga gacggggttt 3420  
caccgtttta gccgggatgg tctcgatctc ctgacctgt gatccgccc cctcggcctc 3480  
ccaaagtgtt gggattacag gcgtgagcca ccgcgcccgg cctactgctc actctttggg 3540  
tccactctgc tttcatgagc tgtaacactc accgtgaaga tctgcagctt cactcctgag 3600  
cccagcgaga ccacgagccc accgggaaga acgaacaact ccagacgctc tgccttaaga 3660  
gotgtaacac tcaccgccta ggtctgcagc ttcaatcctg agccagcgag accacgaacc 3720  
caccagaagg aagaaactcc gaacacatct gaacatcaga agtaacaaac tccagacgca 3780  
ccaccttaag agctgtaccc actcaccgcg agggatatgc gcttcattct tgaagtcagt 3840  
gagaccaaga accaccaat tccagacaca ctatgggctc acagcgtgta ctgcgcaca 3900  
cgcagtcagg tgtggatgta caccgcgca caccaggca catgtacacc cgcgcgctca 3960  
cacaccccat ccagctacag cagaattctg gcgaggctgt tgaccgcaca cctgctgcct 4020  
ccttggccac cctgtccaca cagtagcccg atcgaccccc gtggcggccg agaccagcg 4080  
ccatccgcag ccctgagacc tccctaggga ttgcaccag cagccagtca ccggcctccg 4140  
cggcctggcc agttgagggt ggccgtgacc gcggggccag gagcgccgc acatctcggg 4200  
gcaaattggc cgggggaaga gtttctcct cagcctcccc gtctccgac gctccgcaa 4260  
ctccagagcg aggcacgcgc ctttaaaggc aggtccgcgg ctctcccacg tcctggcgcc 4320  
cggttttccg caccagtggt ccccacagct gtgcccgggc acagaggcgc ggccagaccg 4380  
cactccgcgg gctgcaggtg tcccggcctc tggcggcgcc ggtgcggccc ggaggtggga 4440  
gcccgcggag cactgcagt agctggagtc ccgccgagtc ccagcccca aggcagggca 4500  
ggagcgcgca ccggccggag gtccatgctg agcatcgccc gcgcccgtgc ccggcagcct 4560  
ctccaactgt gtggtccccg cgctggcaga gaggcacgga ctgcaggccg tgggcagctc 4620  
catcttcccg cgtcctcctc ctctggcgct gcccgctgtc tccgccttc cctctgctcc 4680  
cctctcgctt ccgcctcagc gcccgcgtga cctcgctcc tcccctctgc tctttgtccc 4740  
tgcactctcc cctcctcggt cctctgacct ccccgccctc acctcctccc ctctctctc 4800  
ccctgcccgc ccgcgctct cccaccgctc ccgcgcccc cgccgcgcgc gctgccactc 4860  
cgccccccgc gccgcacgga gottcagtaa taaccccggc gcggcggcgg agtcgctgtg 4920  
gggaatcctc ccgcgctctg cctgggtcgg gtctccctg cccgctcgca cgctgccggc 4980

22/26

cggggaccct ccggtggccc ctagccctc ggagcgtcc tgg

5023

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

tttgagacgg agtctcgctc tgcgcccag

30

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

ccaggagcgc tccgaggggc taggggcca

29

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 20

aagagctctg ctagctgaga cggagtctcg ctctgtcgcc cag

43

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 43

23/26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 21

taaagcttag atctccagga gcgctcogag gggctagggg cca

43

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 22

aaacgcgtat atgaactaca aaaattttgc acacaatcat tg

42

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 23

catctggccc ttcacagaaa aatgt

25

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

24/26

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 24

cctaggtatc tccatgtgat agac

24

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 25

aaggcagcta aggctcggca agaaatcgag

30

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 26

gtttggtcct tttaatctaa aatgccattt g

31

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 27

atggtgtctt gggctctggc ttct

25

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

25/26

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 28

aacaaagggc agctgaaggc ccaggatcca c

31

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 29

tggacagggc ggccaaggag gcagcagg

28

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus sp.

&lt;400&gt; 30

agcctagctc ccgatccaa

19

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus sp.

&lt;400&gt; 31

ccaccaccag agtctccaca t

21

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

26/26

<213> Rattus sp.

<400> 32

aagcaggcgg ccgag

15

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 33

atcaaaggtg gaagaatggg a

21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07807

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10,  
A61P13/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10,  
A61P13/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)  
SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Database GenBank Accession No.AC010269, 23 August, 2001 (23.08.01), DOE Joint Genome Institute and Stanford Human Genome Center, "Homo sapiens chromosome 5 clone CTC-485121, complete sequence.", Direct Submission, refer to base Nos. 44640 to 46410	<u>1-3</u> 4-11
A	WO 02/31163 A1 (Kazusa DNA Research Institute Foundation), 18 April, 2002 (18.04.02), & AU 200194218 A	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
15 July, 2003 (15.07.03)

Date of mailing of the international search report  
29 July, 2003 (29.07.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A61P13/12

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/11, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A61P13/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

SwissProt/PIR/Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Database GenBank Accession No.AC010269, 23 Aug 2001, DOE Joint Genome Institute and Stanford Human Genome Center, "Homo sapiens chromosome 5 clone CTC-485121, complete sequence." Direct Submission 塩基番号44640~46410参照	1-3 4-11
A	WO 02/31163 A1 (財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所) 2002.04.18 & AU 200194218 A	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.07.03

国際調査報告の発送日

29.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子



4B

3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488